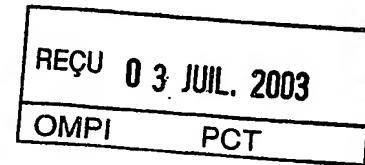


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

PCT/EP03/03519

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 16 738.9

Anmeldetag: 16. April 2002

Anmelder/Inhaber: Bayer CropScience AG,
Monheim, Rheinl/DE

Erstanmelder: Bayer Aktiengesellschaft,
Leverkusen/DE

Bezeichnung: Helicokinin-Rezeptor aus Insekten

IPC: C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Februar 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Helicokinin-Rezeptor aus Insekten

Die Erfindung betrifft Polypeptide, welche die biologische Aktivität eines
5 Helicokinin-Rezeptors ausüben, sowie Polynukleotide, die für diese Polypeptide
codieren und insbesondere deren Verwendung zum Auffinden von Wirkstoffen für
den Pflanzenschutz.

Die Entwicklung von Pestiziden hat sich traditionell vor allem auf die chemischen
10 und physikalischen Eigenschaften der bekannten, pestizid wirksamen chemischen
Verbindungen konzentriert. Als Konsequenz daraus wurde der Schwerpunkt der
weiteren Bearbeitung besonders bei der Modifizierung von bereits existierenden
chemischen Verbindungen und nicht auf die Auffindung und Entwicklung ganz
15 neuartiger Pestizide mit neuen Wirkmechanismen gelegt. Es ist daher von besonderer
Bedeutung für die Entwicklung neuer Pestizide, neue biologische Angriffspunkte
(Target-Proteine) aus z.B. Schadinsekten zu finden, an denen die potentiellen
Pestizide binden und ihre Wirkung entfalten können. Diese neuen Target-Proteine
können dann auf verschiedene Weise exprimiert und die biologische Funktion in
20 verschiedenen biochemischen Testverfahren geprüft werden. Des Weiteren können
mit Hilfe hochdurchsatzfähiger Testverfahren, dem sogenannten Hochdurchsatz-
Screening, eine große Vielfalt von chemischen Substanzen relativ kostengünstig und
schnell auf ihre Wirkung an dem neuen Target-Protein überprüft werden. Da von
Beginn einer solchen Vorgehensweise an klar ist, an welches Target-Protein eine
25 gegebene chemische Substanz bindet, ist es besonders gut möglich, in einem solchen
Target-orientierten Ansatz bei der Entwicklung eines neuen Pestizids auf Selektivität
in der Wirkungsweise und damit auf Sicherheit zu achten. Eine in einem
Hochdurchsatz-Screening oder auf andere Art aufgefundene chemische Verbindung,
die z. B. an einem Target-Protein aus Schadinsekten modulierend wirkt, kann direkt
30 an einem homologen Target-Protein, welches aus einer oder mehreren Säugetier-
Spezies kloniert wurde, auf Selektivität geprüft werden, um breit wirksame toxische
Verbindungen auszuschließen. Besonders gut als Target-Proteine sind solche

Proteine aus z.B. Schadinsekten anzusehen, die nicht in höheren Organismen, wie Säugetieren, vorkommen.

Besonders gut als Target-Proteine und damit als Angriffspunkte für die Entwicklung neuartige Insektizide sind Rezeptoren für biologisch aktive Peptide in Insekten anzusehen. Peptide regulieren die meisten wichtigen Schlüsselfunktionen in Insekten, wie zum Beispiel die Embryonal- und Post-Embryonal Entwicklung, die Ionen-Homeostase, Osmoregulation oder Muskelaktivität (siehe Gäde et al., 1997a; Osborne, 1996). Die biologische Wirkung dieser Peptide wird dabei durch die Bindung an spezifische Rezeptor-Proteine in Insektenzellen vermittelt. Viele dieser endokrinen oder neuronalen Peptide interagieren mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs; King und Wilson, 1999), die nach der Bindung eines korrespondierenden Peptid-Liganden heterotrimere G-Proteine aktivieren (Vanden Broeck et al., 1997). Antagonisten, die an Peptid-Rezeptoren binden können und die von den natürlichen Peptiden abgeleitet sein oder auch eine völlig neuartige chemische Struktur besitzen können, können beispielsweise mit der normalen Insekten-Entwicklung, dem Wachstum, dem Verhalten oder der Homeostase interferieren und auf diese Weise Insekten-spezifische und Rezeptor-spezifische neuartige Insektizide generieren.

Seit der Isolierung des Neuropeptids Proctolin aus Insekten-Muskelpräparationen (Brown und Starratt, 1975) ist eine Vielzahl von Peptiden aus verschiedenen Insekten-Spezies isoliert und charakterisiert worden (zur Übersicht siehe Vanden Broeck et al., 1997; Osborne, 1996). Substantieller Fortschritt wurde vor allem bei der Aufklärung der Aminosäuresequenz solcher Peptide und bei der Aufklärung der biologischen Funktion in den entsprechenden Insekten-Spezies gemacht. So konnten beispielsweise Peptide, die die Juvenilhormon-Biosynthese beeinflussen können (Allatotropine und Allatostatine, Tobe et al., 1994), Insulin-artige Peptide (Lagueux et al., 1990), Peptide, die den Wasserhaushalt regulieren (Coast, 1998), oder solche Peptide, die die Muskelaktivität steuern können (Holman, 1986; zur Übersicht siehe Gäde, 1997b) aus verschiedenen Spezies isoliert werden.

Peptide aus der Gruppe der Kinine sind aus einer Reihe von Insekten-Spezies aus verschiedenen Familien, u.a. aus Dictyoptera, Orthoptera und Lepidoptera, isoliert worden (Coast, 1998; Blackburn et al., 1995). Sie haben als Gemeinsamkeit eine
5 hochkonservierte Struktur mit einem carboxyterminalen Pentapeptid der Sequenz Phenylalanin-Xaa-Xbb-Tryptophan-Glycin-Amid, wobei Xaa entweder Tyrosin, Histidin, Serin oder Asparagin sein kann, und wobei Xbb entweder Alanin, meist aber Serin oder Prolin sein kann (Coast, 1998). Verwandte Peptide wurden auch aus anderen Invertebraten, wie Mollusken oder Krebsen, isoliert (Cox et al., 1997; Torfs
10 et al., 1999). Die ersten Mitglieder dieser Peptid-Familie wurden auf der Basis ihrer Fähigkeit isoliert, Kontraktionen beim isolierten Darm in Schaben auszulösen (Holman, 1991). Kinine sind in Insekten besonders potente, diuretisch wirkende Peptide, die die Sekretion von primärem Urin in den Malpighischen Organen stimulieren (Coast, 1998).

15 Die biologischen Funktionen der Peptide können in verschiedenen Testen überprüft werden, welche beispielsweise die Muskelaktivität (Holman, 1991) oder die Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten (Ramsey, 1954) messen. Von einigen dieser biologisch aktiven Peptide ist beschrieben, dass in vivo eine experimentell
20 induzierte übersteigerte Wirkung zum Absterben der Schadinsekten führen kann (Seinsche et al., 2000).

Während eine Vielzahl von Peptiden isoliert, in der Struktur aufgeklärt und die Aminosäuresequenz beschrieben werden konnte, sind demgegenüber in Insekten nur
25 wenige Rezeptoren bekannt, die endokrine oder neuronale Peptide binden können. Beschrieben sind u.a. Rezeptoren für das Diuretische Hormon aus *Manduca sexta* (Reagan, 1994) oder *Bombyx mori* (Ha et al., 2000), für Tachykinin aus *Drosophila* (Li et al., 1991; Monnier et al., 1992), oder für Galanin aus *Drosophila* (Birgul et al., 1999).

30

Rezeptoren von Kinin-Peptiden sind in Mollusken aus der Teichschnecke *Lymnea stagnalis* (Cox et al., 1997) und in Acari aus einer Zeckenart (*Boophilus microplus*, Holmes et al., 2000) beschrieben. Aus Insekten ist nur in *Drosophila melanogaster* ein Rezeptor für ein *Drosophila*-Kinin beschrieben (Terhzaz et al., 1999). Die
5 zelluläre Antwort auf eine Kinin-Stimulation in Insekten ist ein Anstieg in der intrazellulären Calcium-Konzentration, die letztlich zu einem Einstrom von Chlorid-Ionen in das Lumen der Malpighischen Gefäße führt (Coast, 1998). In Larven des Schadinsektes *Heliothis virescens* führt die Wirkung der Kinine zum einen zur erhöhten Flüssigkeits-Sekretion an isolierten Malpighischen Gefäßen und zum
10 anderen nach Injektion in die Hämolymphe der Larven zur Reduktion der Gewichtszunahme und zu partieller Mortalität (Seinsche et al., 2000). Es ist daher von besonderem Interesse, die Rezeptoren für die Kinine aus wirtschaftlich bedeutsamen Schadinsekten bereitzustellen.

15 Seitdem das Genom von *Drosophila* in Teilen oder komplett als in Datenbanken recherchierbare Sequenz zur Verfügung steht, sind verschiedene Rezeptoren aus dieser Spezies beschrieben oder vorhergesagt worden (Hauser et al., 1998; Lenz et al., 2000a; Lenz et al., 2000b; Eriksen et al., 2000; Vanden Broeck, 2001; Hewes und
20 Tahert, 2001; WO 00/70980; WO 00/31005). *Drosophila melanogaster* aus der Familie der Dipteren ist ein wichtiger Modellorganismus für die Insekten-Genetik, spielt in der Landwirtschaft als Schadinsekt aber keine große Rolle. Die Unterschiede in den Aminosäure-Sequenzen zwischen z.B. homologen Genen aus *Drosophila melanogaster* und anderen Insekten aus anderen Familien oder anderen Invertebraten ist mitunter beträchtlich und überschreitet oft 50% (Hewes und Taghert, 2001). Die
25 Unterschiede auf der Ebene der Nukleotide ist dabei noch größer. Es gelingt daher oft nicht, mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden (z.B. mittels PCR mit DNA-Primern oder mit DNA-Sonden, die von z.B. *Drosophila*-Genen abgeleitet sind) die interessierenden homologen Rezeptor-Gene in einem Invertebraten-Organismus (z.B. einer Lepidopteren-Spezies) aufzufinden und zu isolieren
30 (Pietrantonio et al., 2000).

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, weitere Rezeptoren, an die endokrine oder neuronale Peptide aus Insekten, insbesondere aus wirtschaftlich bedeutsamen Schadinsekten, binden können und über deren Bindung die biologische Funktionen dieser Peptide vermittelt werden kann, und darauf aufbauende Testsysteme mit einem hohen Durchsatz an Testverbindungen (High Throughput Screening Assays; HTS-Assays) bereitzustellen.

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung von Polypeptiden, welche zumindest eine biologische Aktivität eines Helicokinin-Rezeptors ausüben und eine Aminosäuresequenz umfassen, die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise zumindest 80 %ige Identität, besonders bevorzugt zumindest 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt zumindest 95 %ige Identität, mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fortlaufenden Aminosäuren und ganz besonders bevorzugt über deren Gesamtlänge aufweisen.

Der Grad der Identität der Aminosäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programmpaket GCG, Version 9.1 unter Standardeinstellungen (Devereux et al., 1984).

Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranslationale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise an dem Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit

5 Flavin, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

10 Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen.

15 Die erfindungsgemäßen Polypeptide müssen nicht vollständige Rezeptoren darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität eines vollständigen Helicokinin-Rezeptors aufweisen. Polypeptide, die im Vergleich zu dem Helicokinin-Rezeptor, der aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 besteht, eine um 50 % höhere oder verminderte Aktivität ausüben, werden noch als
20 erfindungsgemäß betrachtet.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können im Vergleich zu der entsprechenden Region natürlich vorkommender Rezeptoren Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der
25 vollständigen Helicokinin-Rezeptoren ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

- 30
1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
 2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;

3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
 4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
 5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.
- 5 Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Der Ausdruck "biologische Aktivität eines Helicokinin-Rezeptors", wie er hierin verwendet wird, bedeutet die Bindung von Helicokinin an einen Peptid-Rezeptor.

Bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Polypeptide stellen Helicokinin-Rezeptoren von Lepidopteren, insbesondere von *Heliothis virescens* dar.

5 Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polypeptide stellt der Helicokinin-Rezeptor von *Heliothis virescens* dar, welcher die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 besitzt.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Polynukleotide, die für die erfindungsgemäßen Polypeptide codieren.

Bei den erfindungsgemäßen Polynukleotiden handelt es sich insbesondere um einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genomischer DNA, die Introns enthalten können, und cDNAs.

15 Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polynukleotide stellt eine cDNA dar, welche eine Polynukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 1 besitzt.

20 Polynukleotide, welche unter stringenten Bedingungen an die Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 hybridisieren, sind ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfasst.

25 Der Ausdruck "hybridisieren", wie er hierin verwendet wird, beschreibt den Vorgang, bei welchem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem komplementären Strang eine Basenpaarung eingeht. Auf diese Weise können ausgehend von der hierin offenbarten Sequenzinformation beispielsweise DNA-Fragmente aus anderen Insekten als *Heliothis virescens* isoliert werden, welche für Polypeptide mit der biologischen Aktivität von Helicokinin-Rezeptoren codieren.

30 Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen sind nachstehend angegeben:

Hybridisierungslösung: 6X SSC / 0 % Formamid, bevorzugte Hybridisierungslösung:
6X SSC / 25 % Formamid

Hybridisierungstemperatur: 34°C, bevorzugte Hybridisierungstemperatur: 42°C

5

1. Waschschrift: 2X SSC bei 40°C,
2. Waschschrift: 2X SSC bei 45°C; bevorzugter 2. Waschschrift: 0,6X SSC bei 55°C;
besonders bevorzugter 2. Waschschrift: 0,3X SSC bei 65°C.

10

Weiterhin sind von der vorliegenden Erfindung Polynukleotide umfasst, die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise zumindest 80 %ige Identität, besonders bevorzugt zumindest 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt zumindest 95 %ige Identität, mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fortlaufenden Nukleotiden und ganz besonders bevorzugt über deren Gesamtlänge aufweisen.

15

Der Grad der Identität der Polynukleotidsequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programmpaket GCG, Version 9.1 unter Standardeinstellungen.

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin DNA-Konstrukte, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid und einen heterologen Promotor umfassen.

25

Der Ausdruck "heterologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der andere Eigenschaften als derjenige Promotor aufweist, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert. Der Ausdruck "Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich allgemein auf Expressionskontrollsequenzen.

30

Die Auswahl von heterologen Promotoren ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen oder zellfreie Systeme verwendet werden. Beispiele

für heterologe Promotoren sind der frühe oder späte Promotor des SV40, des Adenovirus oder des Cytomegalovirus, das lac-System, das trp-System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen lambda, die Kontrollregionen des fd-Hüllproteins, der Promotor des für 3-Phosphoglyceratkinase codierenden Gens, der
5 Promotor des für Saure Phosphatase codierenden Gens und der Promotor des für den α -Mating-Faktor der Hefe codierenden Gens.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Vektoren, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid bzw. ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren
10 können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Plasmide, Phasmide, Cosmide, YACs oder künstliche Chromosomen verwendet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Wirtszellen, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid, ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten.
15

Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäßen Polynukleotide nicht enthalten.

20 Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, wie Bakterien der Gattungen Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces, Streptococcus, Staphylococcus, vorzugsweise E. coli, als auch eukaryotische Zellen, wie Hefen, Säuger-, Amphibien-, Insekten- oder Pflanzenzellen. Bevorzugte eukaryotische Wirtszellen sind HEK-293-, Schneider S2-, Spodoptera Sf9-, Kc-, CHO-, COS1-, COS7-, HeLa-,
25 C127-, 3T3- oder BHK-Zellen und insbesondere Xenopus-Oocyten.

Weiterhin sind Antikörper Gegenstand der Erfindung, die spezifisch an die vorstehend genannten Polypeptide bzw. Rezeptoren binden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt auf die übliche Weise. Beispielsweise können solche Antikörper
30 produziert werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für die Antikörperproduktion effektiven Menge eines erfindungsgemäßen

Polypeptids oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers. Weiterhin lässt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert. Die Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein. Bevorzugte Beispiele für
5 ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin. Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen. Daher erstreckt sich der Ausdruck "Antikörper", wie er hierin verwendet wird, auch auf Teile vollständiger Antikörper, wie Fa-, F(ab')₂- oder Fv-Fragmente, welche noch die Fähigkeit besitzen, an die Epitope der erfindungsgemäßen Polypeptide zu binden.
10

Die erfindungsgemäßen Polynukleotide können insbesondere zur Herstellung transgener Invertebraten verwendet werden. Diese können in Testsysteme eingesetzt werden,
15 die auf einer vom Wildtyp abweichenden Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide basieren. Ferner kann man auf der Grundlage der hierin offenbarten Informationen transgene Invertebraten herstellen, bei denen durch die Modifikation anderer Gene oder Promotoren eine Veränderung der Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide eintritt.
20

Die Herstellung der transgenen Invertebraten erfolgt beispielsweise bei *Drosophila melanogaster* durch P-Element vermittelten Gentransfer (Hay et al., 1997) oder in *Caenorhabditis elegans* durch Transposon-vermittelten Gentransfer (z.B. durch Tc1; Plasterk, 1996).
25

Gegenstand der Erfindung sind somit auch transgene Invertebraten, die zumindest ein erfindungsgemäßes Polynukleotid enthalten, vorzugsweise transgene Invertebraten der Arten *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, sowie deren transgene Nachkommen. Vorzugsweise enthalten die transgenen Invertebraten die erfindungsgemäßen Polypeptide in einer vom Wildtyp abweichenden Form.
30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Polypeptide. Zur Herstellung der Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Polynukleotiden codiert werden, können Wirtszellen, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Dabei kann das zu exprimierende Polynukleotid an die "Codon Usage" der Wirtszellen angepasst werden. Die gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem Kulturmedium isoliert werden. Die Polypeptide können auch in in vitro-Systemen hergestellt werden.

Ein schnelles Verfahren zum Isolieren der erfindungsgemäßen Polypeptide, die von Wirtszellen unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Polynukleotids synthetisiert werden, beginnt mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise Glutathion S-Transferase sein. Das Fusionsprotein kann dann an einer Glutathion-Affinitätssäule gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und dem zu reinigenden erfindungsgemäßen Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden.

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie.

Da die erfindungsgemäßen Helicokinin-Rezeptoren Membranproteine darstellen, werden in den Reinigungsverfahren vorzugsweise Detergensextraktionen durchgeführt, beispielsweise unter Verwendung von Detergenzien, die die Sekundär- und

Tertiärstrukturen der Polypeptide nicht oder nur wenig beeinflussen, wie nicht-ionische Detergenzien.

Die Reinigung der erfindungsgemäßen Polypeptide kann die Isolierung von
5 Membranen ausgehend von Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide
exprimieren, umfassen. Vorzugsweise exprimieren solche Zellen die erfindungs-
gemäßen Polypeptide in einer ausreichenden Kopienanzahl, so dass die Menge der
Polypeptide in einer Membranfraktion mindestens 10-fach höher ist als diejenige, die in
vergleichenbaren Membranen von Zellen gefunden wird, die Helicokinin-Rezeptoren
10 natürlicherweise exprimieren; besonders bevorzugt ist die Menge mindestens 100-fach,
ganz besonders bevorzugt mindestens 1000-fach höher.

Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden,
bedeuten, dass die erfindungsgemäßen Polypeptide von anderen Proteinen oder
15 anderen Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden.
Vorzugsweise ist eine die erfindungsgemäßen Polypeptide enthaltende Zusammen-
setzung hinsichtlich des Proteingehalts an erfindungsgemäßen Polypeptiden gegen-
über einem Rohextrakt aus Wirtszellen mindestens 10-fach und besonders bevorzugt
mindestens 100-fach angereichert. Die Reinheit bzw. der Proteingehalt der
20 Präparationen kann auf an sich bekannte Weise, beispielsweise durch SDS-Poly-
acrylamid-Gelelektrophorese, bestimmt werden.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von
Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

25 Ferner sind auch Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Polynukleotide
Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die erfindungsgemäßen Polynukleotide
können auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise können die Poly-
nukleotide vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch nur kurze Stücke
30 der erfindungsgemäßen Polynukleotide chemisch synthetisieren und solche Oligo-
nukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten

Oligonukleotide können verwendet werden, um ausgehend von Insekten-mRNA hergestellte cDNA-Banken oder ausgehend von genomischer Insekten-DNA hergestellte genomische Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA ausgewählt.
5 Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäßen Polynukleotide.

Die erfindungsgemäßen Polynukleotide können auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

10

Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bedeutet DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden chemisch synthetisiert und können als Sonden verwendet werden.

15

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Polynukleotide bzw. Polypeptide können neue Wirkstoffe für den Pflanzenschutz bzw. pharmazeutische Wirkstoffe für die Behandlung von Mensch und Tier, wie chemische Verbindungen, welche als Modulatoren, insbesondere als Agonisten oder Antagonisten, die Eigenschaften der erfindungsgemäßen
20 Helicokinin-Rezeptoren verändern, identifiziert werden. Dazu wird ein rekombinantes DNA-Molekül, das zumindest ein erfindungsgemäßes Polynukleotid umfasst, in eine geeignete Wirtszelle eingebracht. Die Wirtszelle wird in Gegenwart einer Verbindung oder einer Probe, welche eine Vielzahl von Verbindungen umfasst, unter Bedingungen kultiviert, die die Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren erlauben. Eine Veränderung der Rezeptoreigenschaften kann beispielsweise wie nachstehend in Beispiel 2
25 beschrieben detektiert werden. Auf diese Weise ist es möglich, beispielsweise insektizide Substanzen aufzufinden.

30

Rezeptoren verändern vorzugsweise nach Aktivierung die Konzentration von intrazellulärem cAMP oder intrazellulärem Calcium über eine Interaktion mit G-Proteinen. Veränderungen der Rezeptoreigenschaften durch chemische Verbindungen können

deshalb nach heterologer Expression zum Beispiel durch Messung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen direkt über ELISA-Assaysysteme (Biomol, Hamburg, Deutschland) oder RIA-Assaysysteme (NEN, Schwalbach, Deutschland) im HTS-Format gemessen werden. Eine indirekte Messung der cAMP-Konzentration ist mit Hilfe von Reportergenen (z.B. Luziferase) möglich, deren Expression von der cAMP-Konzentration abhängig ist (Stratowa et al., 1995). Die Koexpression von Rezeptoren mit besonderen G-Proteinen, z.B. $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$ oder auch chimären G-Proteinen, in heterologen Systemen und die Messung des Anstiegs von Calcium, z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Äquorin, ist eine alternative Screeningmöglichkeit (Stables et al., 1997; Conklin et al., 1993).

Weiterhin kann die Bindung von GTP an das aktivierte G-Protein als read-out-System für die Prüfung von Substanzen herangezogen werden.

15. Die erfindungsgemäßen Polynukleotide bzw. Polypeptide ermöglichen auch das Auffinden von Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Rezeptoren binden, ohne dass eine Aktivitätsänderung der Rezeptoren gemessen werden muss. Beispielsweise werden Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide enthalten und die entsprechenden Rezeptoren bzw. Polypeptide exprimieren oder die Genprodukte selbst mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Wechselwirkung zumindest einer Verbindung mit den Wirtszellen, den Rezeptoren oder den einzelnen Polypeptiden erlauben. In solchen Bindungsexperimenten können die erfindungsgemäßen Polypeptide in markierter Form eingesetzt werden.

25 Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die erfindungsgemäßen Rezeptoren aktiviert.

30 Der Ausdruck "Antagonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das einen Agonisten von seiner Bindungsstelle verdrängt.

Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können Mimetika von natürlichen Substraten und Liganden darstellen.

10 Vorzugsweise handelt es sich bei den Modulatoren um kleine organisch-chemische Verbindungen.

Die Bindung der Modulatoren an die erfindungsgemäßen Polypeptide kann die zellulären Vorgänge auf eine Weise verändern, die zum Absterben, zur Paralyse oder zur Sterilität der damit behandelten Insekten führt. In vivo-Tests an Insekten, Insektenlarven oder Insekteneiern zum Verifizieren der insektiziden Eigenschaften der aufgefundenen Modulatoren sind hinlänglich bekannt.

20 Daher erstreckt sich die vorliegende Erfindung auch auf die Verwendung von Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide als Insektizide oder Arzneimittel - im Folgenden "Wirkstoffe" genannt.

Die Wirkstoffe können in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie Lösungen, Emulsionen, Spritzpulver, Suspensionen, Pulver, Stäubemittel, Pasten, lösliche Pulver, Granulate, Suspensions-Emulsions-Konzentrate, Wirkstoff-imprägnierte Natur- und synthetische Stoffe sowie Feinstverkapselungen in polymeren Stoffen.

30 Diese Formulierungen werden in bekannter Weise hergestellt, z.B. durch Vermischen der Wirkstoffe mit Streckmitteln, also flüssigen Lösungsmitteln und/oder festen Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von oberflächenaktiven Mitteln, also Emulgiermitteln und/oder Dispergiermitteln und/oder schaum erzeugenden Mitteln.

Im Falle der Benutzung von Wasser als Streckmittel können z.B. auch organische Lösungsmittel als Hilfslösungsmittel verwendet werden. Als flüssige Lösungsmittel kommen im wesentlichen in Frage: Aromaten, wie Xylol, Toluol, oder Alkylnaphthaline, chlorierte Aromaten und chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie 5 Chlorbenzole, Chlorethylene oder Methylenchlorid, aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Cyclohexan oder Paraffine, z.B. Erdölfractionen, mineralische und pflanzliche Öle, Alkohole, wie Butanol oder Glykol sowie deren Ether und Ester, Ketone wie Aceton, Methylethylketon, Methylisobutylketon oder Cyclohexanon, stark polare 10 Lösungsmittel, wie Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid, sowie Wasser.

Als feste Trägerstoffe kommen in Frage:
z.B. Ammoniumsalze und natürliche Gesteinsmehle, wie Kaoline, Tonerden, Talkum, Kreide, Quarz, Attapulgit, Montmorillonit oder Diatomeenerde und syntheti- 15 sche Gesteinsmehle, wie hochdisperse Kieselsäure, Aluminiumoxid und Silikate, als feste Trägerstoffe für Granulate kommen in Frage: z.B. gebrochene und fraktionierte natürliche Gesteine, wie Calcit, Marmor, Bims, Sepiolith, Dolomit sowie synthetische Granulate aus anorganischen und organischen Mehlen sowie Granulate aus organischem Material, wie Sägemehl, Kokosnussschalen, Maiskolben und Tabak- 20 stängeln; als Emulgier- und/oder schaum erzeugende Mittel kommen in Frage: z.B. nichtionogene und anionische Emulgatoren, wie Polyoxyethylen-Fettsäure-Ester, Polyoxyethylen-Fettalkohol-Ether, z.B. Alkylaryl-polyglykolether, Alkylsulfonate, Alkylsulfate, Arylsulfonate sowie Einweißhydrolysate; als Dispergiermittel kommen infrage: z.B. Lignin-Sulfitablaugen und Methylcellulose.

25 Es können in den Formulierungen Haftmittel, wie Carboxymethylcellulose, natürliche und synthetische pulvrige, körnige oder latexförmige Polymere verwendet werden, wie Gummiarabicum, Polyvinylalkohol, Polyvinylacetat, sowie natürliche Phospholipide, wie Kephaline und Lecithine und synthetische Phospholipide. 30 Weitere Additive können mineralische und vegetabile Öle sein.

Es können Farbstoffe, wie anorganische Pigmente, z.B. Eisenoxid, Titanoxid, Ferrocyanblau und organische Farbstoffe, wie Alizarin-, Azo- und Metallphthalocyanin-farbstoffe und Spurennährstoffe, wie Salze von Eisen, Mangan, Bor, Kupfer, Kobalt, Molybdän und Zink verwendet werden.

5

Die Formulierungen enthalten im allgemeinen zwischen 0,1 und 95 Gew.-% Wirkstoff, vorzugsweise zwischen 0,5 und 90 %.

10

Die Wirkstoffe können vorzugsweise als Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden, insbesondere zur Bekämpfung von Insekten aus der Ordnung der Lepidoptera, wie z.B. *Pectinophora gossypiella*, *Bupalus piniarius*, *Cheimatobia brumata*, *Lithocolletis blancardella*, *Hyponomeuta padella*, *Plutella xylostella*, *Malacosoma neustria*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Lymantria* spp., *Bucculatrix thurberiella*, *Phyllocnistis citrella*, *Agrotis* spp., *Euxoa* spp., *Feltia* spp., *Earias insulana*, *Heliothis* spp., *Mamestra brassicae*, *Panolis flammea*, *Spodoptera* spp., *Trichoplusia ni*, *Carpocapsa pomonella*, *Pieris* spp., *Chilo* spp., *Pyrausta nubilalis*, *Ephestia kuehniella*, *Galleria mellonella*, *Tineola bisselliella*, *Tinea pellionella*, *Hofmannophila pseudospretella*, *Cacoecia podana*, *Capua reticulana*, *Choristoneura fumiferana*, *Clysia ambiguella*, *Homona magnanima*, *Tortrix viridana*, *Cnaphalocerus* spp., *Oulema oryzae*.

15

20

Die Behandlung der Pflanzen und Pflanzenteile mit den Wirkstoffen erfolgt direkt oder durch Einwirkung auf deren Umgebung, Lebensraum oder Lagerraum nach den üblichen Behandlungsmethoden, z.B. durch Tauchen, Sprühen, Verdampfen, Vernebeln, Streuen, Aufstreichen und bei Vermehrungsmaterial, insbesondere bei Samen, weiterhin durch ein- oder mehrschichtiges Umhüllen.

25

30

Die Wirkstoffe eignen sich auch zur Bekämpfung von Insekten, die landwirtschaftliche Nutztiere, wie z.B. Rinder, Schafe, Ziegen, Pferde, Schweine, Esel, Kamele, Büffel, Kaninchen, Hühner, Puten, Enten, Gänse, Bienen, sonstige Haustiere, wie z.B. Hunde, Katzen, Stubenvögel, Aquarienfische sowie sogenannte Versuchstiere, wie z.B. Hamster, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse befallen.

Durch die Bekämpfung dieser Insekten sollen Todesfälle und Leistungsminderungen (bei Fleisch, Milch, Wolle, Häuten, Eiern, Honig usw.) vermindert werden, so dass durch den Einsatz der Wirkstoffe eine wirtschaftlichere und einfachere Tierhaltung möglich ist.

5

10

Die Anwendung der Wirkstoffe geschieht im Veterinärsektor in bekannter Weise durch enterale Verabreichung in Form von beispielsweise Tabletten, Kapseln, Tränken, Drenchen, Granulaten, Pasten, Boli, des feed-through-Verfahrens, von Zäpfchen, durch parenterale Verabreichung, wie zum Beispiel durch Injektionen (intramuskulär, subcutan, intravenös, intraperitoneal u.a.), Implantate, durch nasale Applikation, durch dermale Anwendung in Form beispielsweise des Tauchens oder Badens (Dippen), Sprühens (Spray), Aufgießens (Pour-on und Spot-on), des Waschens, des Einpuderns sowie mit Hilfe von wirkstoffhaltigen Formkörpern, wie Halsbändern, Ohrmarken, Schwanzmarken, Gliedmaßenbändern, Halftern, Markierungsvorrichtungen usw.

15

20

Bei der Anwendung für Vieh, Geflügel, Haustiere etc. kann man die Wirkstoffe als Formulierungen (beispielsweise Pulver, Emulsionen, fließfähige Mittel), die die Wirkstoffe in einer Menge von 1 bis 80 Gew.-% enthalten, direkt oder nach 100 bis 10 000-facher Verdünnung anwenden oder sie als chemisches Bad verwenden.

25

Unter Verwendung von Wirtszellen oder transgenen Invertebraten, die die erfindungsgemäßen Polynukleotide enthalten, ist es auch möglich, Substanzen aufzufinden, welche die Expression der Rezeptoren verändern.

30

Die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Polynukleotide, Vektoren und regulatorischen Regionen können außerdem zum Auffinden von Genen verwendet werden, die für Polypeptide codieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Rezeptoren in Insekten beteiligt sind. Unter funktionell ähnlichen Rezeptoren werden gemäß der vorliegenden Erfindung Rezeptoren verstanden, die Polypeptide umfassen, welche sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz von den hierin

beschriebenen Polypeptiden unterscheiden, aber im wesentlichen dieselben Funktionen haben.

5 **Erläuterungen zum Sequenzprotokoll und zur Abbildung1:**

SEQ ID NO: 1 zeigt die Polynukleotidsequenz der isolierten Helicokinin-Rezeptor-cDNA. SEQ ID NO: 2 zeigt die Aminosäuresequenz des Polypeptids, das von der Polynukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 1 codiert wird.

10

Die Abbildung 1 zeigt das Ergebnis der elektrophysiologischen Messung nach Injektion von Helicokinin-Rezeptor-DNA in Xenopus-Oocyten und der Zugabe von Helicokinin-Peptid (Helicokinin III, 100nM, Blackburn et al., 1995) im Vergleich zur Applikation von Peptid an Kontroll-Oocyten, in denen vorher keine Helicokinin-Rezeptor-DNA injiziert wurde.

15

Beispiele:

Beispiel 1

5 Isolierung der beschriebenen Polynukleotidsequenzen

Die Manipulation von Polynukleotiden erfolgte nach Standardmethoden der rekombinanten DNA-Technologie (Sambrook et al., 1989). Die bioinformatische Bearbeitung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem Programmpaket GCG Version 9.1 (GCG Genetics Computer Group, Inc., Madison Wisconsin, USA).

Beispiel 2

Generierung der Expressionskonstrukte

15

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde der Sequenzbereich der SEQ ID NO: 1 amplifiziert und in den Vektor pCMV Script EX (Stratagene, La Jolla, USA) einkloniert.

20

Heterologe Expression

25

Die funktionelle Expression des Helicokinin-Rezeptors aus *Heliothis virescens* erfolgt in *Xenopus*-Oocyten. Dazu werden teilweise auch G-Protein aktivierbare Kalium-Kanäle (GIRK1 und GIRK4) koexprimiert, um die Aktivierung der Rezeptoren zu messen (White et al., 1998).

Oocyten-Messungen

1. Präparation der Oocyten

30

Die Oocyten stammen von einem adulten weiblichen *Xenopus laevis*-Frosch (Firma Horst Kähler, Hamburg, Deutschland). Die Frösche werden in großen Tanks mit zirkulierendem Wasser bei einer Wassertemperatur von 18-20°C gehalten. Teile des

Frosch-Ovars werden unter vollständiger Anaesthesie durch einen kleinen Schnitt im Abdomen (ca. 1cm) entnommen. Anschließend wird das Ovar unter ständigem Schütteln für ca. 140min in 25ml Kollagenase (Typ I, C-0130, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Deisenhofen, Deutschland; 355U/ml, angesetzt in Barth's Lösung ohne Calcium in mM: NaCl 88, KCl 1, MgSO₄ 0,82, NaHCO₃ 2,4, Tris/HCl 5, pH 7,4) behandelt. Die Oocyten werden dann mit Barth's Lösung ohne Calcium gewaschen. Nur Oocyten im Reifestadium V (Dumont, 1972) werden für die weitere Behandlung ausgewählt und in Mikrotiterplatten (Nunc MicroWell™ Platten, Kat. Nr. 245128 + 263339 (Deckel), Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland), gefüllt mit Barth's-Lösung (in mM: NaCl 88, KCl 1, MgSO₄ 0,82, Ca(NO₃)₂ 0,33, CaCl₂ 0,41, NaHCO₃ 2,4, Tris/HCl 5, pH7.4) sowie Gentamicin (Gentamicin Sulfate, G-3632, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Deisenhofen, Deutschland; 100U/ml), überführt. Die Oocyten werden dann bei 19.2°C in einem Kühl-Brutschrank (Typ KB 53, WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen, Deutschland) aufbewahrt.

2. Injektion der Oocyten

Injektionselektroden, mit einem Durchmesser von 10 – 15 µm, werden mit einem Pipetten-Puller (Typ L/M-3P-A, List-electronic, Darmstadt-Eberstadt, Deutschland) hergestellt. Vor der Injektion werden Aliquots mit der Rezeptor-DNA bzw. GIRK1/4-DNA aufgetaut und mit Wasser auf eine Endkonzentration von 10ng/µl verdünnt. Die DNA-Proben werden mit 3200g für 120s zentrifugiert (Typ Biofuge 13, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Anschließend wird ein ausgezogener PE-Schlauch als Transferschlauch benutzt, um die Pipetten von hinten zu befüllen. Die Injektionselektroden werden an einer X,Y,Z-Verfahreinheit (Bearbeitungszentrum EP1090, isel-automation, Eiterfeld, Deutschland) befestigt. Mit Hilfe eines Macintosh Computers wird die Oocyten in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten angefahren und durch kurze Druckapplikation (0,5-3 bar, 3-6s) ca. 50nl der DNA-Lösung in die Oocyte injiziert.

3. Elektrophysiologische Messungen

Für die elektrophysiologischen Messungen wird eine Zwei-Elektroden-Spannungsklemme mit einem TURBO TEC-10CD (npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) Verstärker durchgeführt. Die hierfür notwendigen Mikropipetten werden aus Aluminiumsilikatglas (Kapillarrohr, Art.-Nr. 14 630 29, l=100mm, $\varnothing_a=1,60\text{mm}$, $\varnothing_i=1,22\text{mm}$, Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) in zwei Zügen gezogen (Hamill et al., 1981). Strom- und Spannungselektroden haben einen Durchmesser von 1 - 3 μm und werden mit 1,5M KCl und 1.5M Kaliumacetat gefüllt. Die Pipetten haben einen kapazitiven Widerstand von 0,2 - 0,5 MW. Für die elektrophysiologischen Messungen werden die Oocyten in eine kleine Kammer überführt, die kontinuierlich mit normaler Rimland-Lösung (in mM: KCl 90, MgCl_2 3, HEPES 5, pH 7,2) gespült wird. Für eine Substanzapplikation wird die Perfusionslösung durch eine Substanzlösung mit gleicher Zusammensetzung und zusätzlich der gewünschten Substanzkonzentration ausgetauscht. Bei einem Klemmpotential von -60mV wird die erfolgreiche Expression der Rezeptor-DNA nach einer Woche überprüft. Nicht reagierende Oocyten werden verworfen. Alle weiteren werden für die Substanztestung verwendet. Die Daten werden mittels eines YT-Schreibers (YT-Schreiber, Model BD 111, Kipp & Zonen Delft BV, AM Delft, Niederlande) dokumentiert. Die einzelnen Werte werden in Origin (Auswertesoftware Microcal Origin, Microcal Software, Inc., Northampton, MA 01060-4410 USA (Additive GmbH, Friedrichsdorf/Ts, Deutschland) eingegeben. Mittelwerte, Standardabweichung, IC_{50} -Werte und IC_{50} -Kurven werden mit Origin berechnet. Diese Messungen wurden mindestens zweimal durchgeführt.

Literatur:

5 Birgul, N. et al. (1999). Reverse physiology in *Drosophila*: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. *EMBO Journal* 18: 5892-5900

10 Blackburn, M. B. et al. (1995). The isolation and identification of three diuretic kinins from the abdominal ventral nerve cord of adult *Helicoverpa zea*. *J. Insect Physiol.* 41 (8): 723-730

Brown, B.E. und Starrall, A.N. (1975). Isolation of proctolin, a myotropic peptide from *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* 21: 1879-1881

15 Coast, G.M. (1998). Insect Diuretic Peptides: Structures, Evolution and Actions. *American Zoology* 38: 442-449

20 Conklin et al. (1993). Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature* 363:274-276

Cox, K.J. et al. (1997). Cloning, characterization, and expression of a G-protein-coupled receptor from *Lymnea stagnalis* and identification of a leucokinin-like peptide, PSFHSWSamide, as its endogenous ligand. *J. Neurosci.* 17:1197-1205

25 Devereux et al. (1984). *Nucleic Acids Research* 12: 387

Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). 1. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136: 153-180

30 Eriksen, K.K. (2000). Molecular cloning, genomic organization, developmental regulation, and a knock-out mutant of a novel leu-rich repeats-containing G-protein-

coupled receptor (DLGR-2) from *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 10:924-938

5 French-Constant, R.H. et al. (1991). Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance on *Drosophila* and invertebrate GABA_A receptor locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 7209-7213

Gäde, G. et al. (1997a). Hormonal regulation in Insects: Facts, Gaps, and Future Directions. *Physiological Reviews* 77: 963-1032

10 Gäde, G. (1997b). The explosion of structural information on insect neuropeptides, In: *Progress in the chemistry of organic natural products* (Herz, W., Kirby, G.W., Moore, R.E., Steglich, W., Tamm, C. eds): 1-128

15 Ha, S.-D. et al (2000). Cloning and sequence analysis of cDNA for Diuretic Hormone Receptor from the *Bombyx mori*. *Mol. Cells* 10: 13-17

20 Hamill, O.P. et al. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfügers Arch.* 391: 85-100

25 Hauser, F. et al. (1998). Molecular cloning, genomic organization and developmental regulation of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors from vertebrates. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 249: 822-828

Hay et al. (1997). P element insertion-dependent gene activation in the *Drosophila* eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (10): 5195-5200

30 Hewes, R. und Taghert, P. (2001). Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Research* 11 (6): 1126-1142

- 5 Holman, G.M. et al. (1986). Isolation, primary structure and synthesis of two neuropeptides from *Leucophaea maderae*: Members of a new family of Cephalomaotrophins. *Comparative Biochemical Physiology* 84C: 205
- 10 Holmes, S.P. et al. (2000). Cloning and transcriptional expression of a leucokinin-like peptide receptor from the Southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). *Insect Molecular Biol.* 9 (5): 457-465
- 15 Holman, G.M. (1991). Insect myotropic peptides: isolation, structural characterization and biological properties. In: *Insect Neuropeptides: Chemistry, Biology and Action* (Menn, J.J., Kelly, T.J., Masler, E.P., eds): 40-50
- King, F.D. und Wilson, S. (1999). Recent advances in 7-transmembrane receptor research. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 2: 83-95
- 20 Lagueux, M. et al. (1990). cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* encoding a novel member of the superfamily of insulins. *European Journal of Biochemistry* 187: 249-254
- 25 Lenz et al. (2000a). Molecular cloning and genomic organization of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to mammalian Galanin Receptors. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 269: 91-96
- 30 Lenz et al. (2000b). Molecular cloning and genomic organization of a second probable allatostatin receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 273: 571-577
- Li, X.J. et al. (1991). Cloning, heterologous expression and developmental regulation of a *Drosophila* receptor for tachykinin-like peptides. *EMBO J.* 10: 3221-3229

- Monnier, D. et al. (1992). NKD, a developmentally regulated tachykinin receptor in *Drosophila*. *J.Biol.Chem.* 267: 1298-1302
- 5 Osborne, R.H. (1996). Insect Neurotransmission: Neurotransmitters and their Receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 69: 117-142
- Pietrantonio, P.V. et al. (2000). Characterization of a leucokinin binding protein in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Malpighina tubule. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 1147-1159
- 10 Plasterk (1996). The Tc1/mariner transposon family, *Transposable Elements/Current Topics in Microbiology and Immunology* 204: 125-143
- 15 Ramsey, J.A. (1954). Active transport of water by the Malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus*. *Journal of Experimental Biology* 31: 104-113
- Reagan, J.D. (1994). Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry* 269: 9-12
- 20 Sambrook et al. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Press
- 25 Seinsche, A. et al. (2000). Effect of helicokinins and ACE inhibitors on water balance and development of *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Insect Physiology* 46: 1423-1431
- Stables et al. (1997). A Bioluminescent Assay for Agonist Activity at Potentially Any G-protein coupled Receptor. *Analytical Biochemistry* 252: 115-126
- 30 Stratowa C. et al. (1995). Use of a luciferase reporter system for characterizing G-protein-linked receptors. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 574-581

Terhzaz, S. et al. (1999). Isolation and characterization of a leucokinin-like peptide of *Drosophila melanogaster*. J. Exp. Biol. 202: 3667-3676

- 5 Tobe, S.S. et al. (1994). Allatostatins, peptide inhibitors of juvenile hormone production in insects. In: Perspectives in Comparative Endocrinology (Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S., eds): 12-19

- 10 Torfs, P. et al. (1999). The kinin peptide family in invertebrates. Ann. NY Acad. Sci. 897: 367-373

Vanden Broeck, J. et al. (1997). Insect Neuropeptides and Their Receptors. Trends in Endocrinology & Metabolism 8: 321-326

- 15 Vanden Broeck, J. (2001). Insect G protein-coupled receptors and signal transduction. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 48: 1-12

White J.H. et al. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. Nature 396: 679-82

Patentansprüche

1. Polypeptid, welches die biologische Aktivität eines Helicokinin-Rezeptors ausübt und eine Aminosäuresequenz umfasst, die eine zumindest 70%ige Identität mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweist.
2. Polypeptid gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuresequenz einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 entspricht.
3. Polynukleotid umfassend eine Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einzelsträngige oder doppelsträngige DNA oder RNA handelt.
5. Polynukleotid gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Fragmente genomischer DNA oder cDNA handelt.
6. Polynukleotid gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleotidsequenz einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 entspricht.
7. Polynukleotid gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es unter stringenten Bedingungen an die Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 hybridisiert.
8. DNA-Konstrukt umfassend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7 und einen heterologen Promotor.
9. Vektor umfassend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7 oder ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 8.

10. Vektor gemäß nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression des Polynukleotids in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.
- 5
11. Wirtszelle enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7, ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 8 oder einen Vektor gemäß Anspruch 9 oder 10.
- 10
12. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine prokaryotische Zelle, insbesondere um E. coli, handelt.
13. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine eukaryotische Zelle, insbesondere um eine Säuger- oder Insektenzelle, handelt.
- 15
14. Antikörper, welcher spezifisch an ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 bindet.
15. Transgener Invertebrat enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7.
- 20
16. Transgener Invertebrat nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Drosophila melanogaster oder Caenorhabditis elegans handelt.
- 25
17. Transgene Nachkommen eines Invertebraten gemäß Anspruch 15 oder 16.
18. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids gemäß Anspruch 1, umfassend
- (a) das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 unter Bedingungen, die die Expression des Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7 gewährleisten, oder
- 30

- (b) das Exprimieren eines Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7 in einem in vitro-System, und
- 5 (c) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle, dem Kulturmedium oder dem in vitro-System.
19. Verfahren zum Herstellen eines Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7, umfassend die folgenden Schritte:
- 10 (a) Vollständige chemische Synthese auf an sich bekannte Weise, oder
- (b) chemische Synthese von Oligonukleotiden, Markieren der Oligonukleotide, Hybridisieren der Oligonukleotide an DNA einer genomischen oder cDNA-Bank, die ausgehend von genomischer DNA bzw. mRNA aus Insektenzellen hergestellt wurde, Selektieren von positiven Klonen und Isolieren der hybridisierenden DNA aus positiven Klonen, oder
- 15 (c) chemische Synthese von Oligonukleotiden und Amplifizierung der Ziel-DNA mittels PCR.
- 20
20. Verfahren zum Herstellen eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 15 oder 16, umfassend das Einbringen eines Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7 oder eines Vektors gemäß Anspruch 9 oder 10.
- 25
21. Verfahren zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz, insbesondere von Verbindungen, welche die Eigenschaften von Polypeptiden gemäß Anspruch 1 verändern, umfassend die folgenden Schritte:
- 30 (a) Bereitstellen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13,

5

- (b) Kultivieren der Wirtszelle in der Gegenwart einer chemischen Verbindung oder einer Probe, welche eine Vielzahl von chemischen Verbindungen umfasst, und

- (c) Detektieren veränderter Eigenschaften.

22. Verfahren zum Auffinden einer chemischen Verbindung, die an ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 bindet, umfassend die folgenden Schritte:

10

- (a) Inkontaktbringen eines Polypeptids gemäß Anspruch 1 oder einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion einer chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben, und

15

- (b) Bestimmen der chemischen Verbindung, die spezifisch an das Polypeptid bindet.

20

23. Verfahren zum Auffinden einer chemischen Verbindung, die die Expression eines Polypeptids gemäß Anspruch 1 verändert, umfassend die folgenden Schritte:

25

- (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 oder eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 15 oder 16 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen,

30

- (b) Bestimmen der Konzentration des Polypeptids gemäß Anspruch 1, und

(c) Bestimmen der chemischen Verbindung, die die Expression des Polypeptids spezifisch beeinflusst.

5 24. Verwendung eines Polypeptids gemäß Anspruch 1, eines Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7, eines Vektors gemäß Anspruch 9 oder 10, einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, eines Antikörpers gemäß Anspruch 14 oder eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 15 oder 16 zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz oder zum Auffinden von Genen, die für Polypeptide codieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Helicokinin-Rezeptoren in Insekten beteiligt sind.

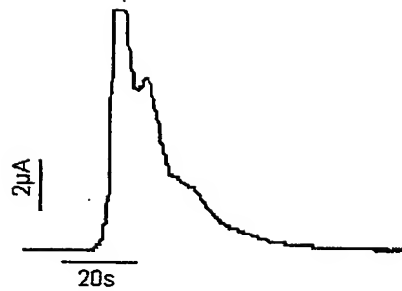
10 25. Verwendung eines Modulators eines Polypeptids gemäß Anspruch 1 als Insektizid.

15

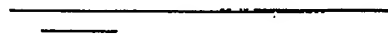
20

25

30



A) Hv-Kinin Rez. exprimierende Oocyte



B) nicht exprimierende Oocyte

Abb. 1: Expression von Helicokinin-Rezeptoren in Xenopus-Oozyten. Signal nach Zugabe von Peptid (Helicokinin III, 100nM für 20 Sekunden) bei A) Oozyten nach Injektion von Helicokinin-Rezeptor DNA, und bei B) Kontroll-Oozyten ohne Helicokinin-Rezeptor DNA

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bayer Aktiengesellschaft

<120> Helicokinin-Rezeptor aus Insekten

<130> Le A 36033

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1452

<212> DNA

<213> Heliothis virescens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1452)

<400> 1

atg gac act agt aca aca aat tca tca caa gat gac gac gcg gac tgg	48
Met Asp Thr Ser Thr Thr Asn Ser Ser Gln Asp Asp Ala Asp Trp	
1 5 10 15	

cca agg aac agt tcc att gac gag tat att ata cac aat gga act aat	96
Pro Arg Asn Ser Ser Ile Asp Glu Tyr Ile Ile His Asn Gly Thr Asn	
20 25 30	

gat aca ttc gaa aca ttg tac gat gtg ccg act ggt atg ata gta ctc	144
Asp Thr Phe Glu Thr Leu Tyr Asp Val Pro Thr Gly Met Ile Val Leu	
35 40 45	

ttg tcg ttc ctg tac ggc tca ata tca gtt ctt gcg gtg gtg ggg aac	192
Leu Ser Phe Leu Tyr Gly Ser Ile Ser Val Leu Ala Val Val Gly Asn	
50 55 60	

ttt ctg gtg atg tgg gtc gtg gcc acc tcg aga aga atg cag agc gtc	240
Phe Leu Val Met Trp Val Val Ala Thr Ser Arg Arg Met Gln Ser Val	
65 70 75 80	

aca aac tgc tac ata gcc aac tta gct tta gct gac ata gtc ata gga	288
Thr Asn Cys Tyr Ile Ala Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ile Val Ile Gly	
85 90 95	

tta ttc gct gta cca ttt caa ttt caa gcc gcg ctg cta cag cgg tgg	336
Leu Phe Ala Val Pro Phe Gln Phe Gln Ala Ala Leu Leu Gln Arg Trp	
100 105 110	
ctg cta ccg cac ttc atg tgt ccg ttc tgc ccg ttc gtg cag gcg ctc	384
Leu Leu Pro His Phe Met Cys Pro Phe Cys Pro Phe Val Gln Ala Leu	
115 120 125	
agt gtc aac gtc agc gtg ttt aca ctg aca gcc atc gca gtt gac aga	432
Ser Val Asn Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Ala Ile Ala Val Asp Arg	
130 135 140	
cat cgg gcg ata atc aca ccg ctc agc gcc cac act tca aag cgt att	480
His Arg Ala Ile Ile Thr Pro Leu Ser Ala His Thr Ser Lys Arg Ile	
145 150 155 160	
gcc aaa gta ata ata gtg gtt ata tgg ttt ctg gcg ctt tct tta gct	528
Ala Lys Val Ile Ile Val Val Ile Trp Phe Leu Ala Leu Ser Leu Ala	
165 170 175	
gct ccg atg gct atg tct tgg gag gtt atc atg gaa gat gaa tta gat	576
Ala Pro Met Ala Met Ser Trp Glu Val Ile Met Glu Asp Glu Leu Asp	
180 185 190	
cca gtt gca aaa atc ttc tac aaa aag ccg ttt tgt gca ccc acc gag	624
Pro Val Ala Lys Ile Phe Tyr Lys Lys Pro Phe Cys Ala Pro Thr Glu	
195 200 205	
ttc ggc tcg cat tca ctc gcc att tat aga ctg ttg ttg tat gta ttt	672
Phe Gly Ser His Ser Leu Ala Ile Tyr Arg Leu Leu Leu Tyr Val Phe	
210 215 220	
cag tat gta atc ccg ttg tgt gtg att acg ttt gcc tac gct cat atg	720
Gln Tyr Val Ile Pro Leu Cys Val Ile Thr Phe Ala Tyr Ala His Met	
225 230 235 240	
gcg atg aag ctg tgg gga gcg cgc gcc cca ggg aac gcg cag gag acg	768
Ala Met Lys Leu Trp Gly Ala Arg Ala Pro Gly Asn Ala Gln Glu Thr	
245 250 255	
agg gac gct aac cac atg cga aac aag aag aag gtg ata aaa atg ttg	816
Arg Asp Ala Asn His Met Arg Asn Lys Lys Lys Val Ile Lys Met Leu	
260 265 270	
gtg ctg gtc gta gct ctg ttt gcg tta tgc tgg ctg ccg cta cag agc	864
Val Leu Val Val Ala Leu Phe Ala Leu Cys Trp Leu Pro Leu Gln Ser	
275 280 285	

tac tta tta cta caa tca ttt ttt cca tca att aac gag tac aag tac 912
 Tyr Leu Leu Leu Gln Ser Phe Phe Pro Ser Ile Asn Glu Tyr Lys Tyr
 290 295 300

atc aac gtg ctt ttc ttt tgc ttc gac tgg cta gca atg agc aac tct 960
 Ile Asn Val Leu Phe Phe Cys Phe Asp Trp Leu Ala Met Ser Asn Ser
 305 310 315 320

tgc tat aac cca ttc atc tat gcc atc tac aac gaa aaa ttc aag aag 1008
 Cys Tyr Asn Pro Phe Ile Tyr Ala Ile Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Lys
 325 330 335

gaa ttc aaa caa cga ttc act ttc ggg aaa aag cca agc aga ttc gtt 1056
 Glu Phe Lys Gln Arg Phe Thr Phe Gly Lys Lys Pro Ser Arg Phe Val
 340 345 350

aac gat agc tac gag gac ggc cag tca tac cga aca aga att tta tcg 1104
 Asn Asp Ser Tyr Glu Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Thr Arg Ile Leu Ser
 355 360 365

ttc cga tca acc aac gac aga agt ggc tat tca tcc aga aag tct ttg 1152
 Phe Arg Ser Thr Asn Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Arg Lys Ser Leu
 370 375 380

aac ata ccg ccg ggg gac act tta aaa gtt cct tct aga aat tca tgt 1200
 Asn Ile Pro Pro Gly Asp Thr Leu Lys Val Pro Ser Arg Asn Ser Cys
 385 390 395 400

cat tgc atg gcg aat cag agc aga gaa aat gga ttt aac ttc atg aaa 1248
 His Cys Met Ala Asn Gln Ser Arg Glu Asn Gly Phe Asn Phe Met Lys
 405 410 415

act gaa gac atg gaa ggg cac gga aat agc agg cgg tat ctg aat ata 1296
 Thr Glu Asp Met Glu Gly His Gly Asn Ser Arg Arg Tyr Leu Asn Ile
 420 425 430

aga atg agt aat cca gat att ggt aaa aga aga tta gct aag aag tta 1344
 Arg Met Ser Asn Pro Asp Ile Gly Lys Arg Arg Leu Ala Lys Lys Leu
 435 440 445

tcg aat aga gac gac atg cct ata ggt gat gag aga gtc agt gaa ctg 1392
 Ser Asn Arg Asp Asp Met Pro Ile Gly Asp Glu Arg Val Ser Glu Leu
 450 455 460

tac ata ttc cca aac agt aac att gta gaa ttt aca gac ata tca tac 1440
 Tyr Ile Phe Pro Asn Ser Asn Ile Val Glu Phe Thr Asp Ile Ser Tyr
 465 470 475 480

gat gac aaa gtg
Asp Asp Lys Val

1452

<210> 2

<211> 484

<212> PRT

<213> *Heliothis virescens*

<400> 2

Met Asp Thr Ser Thr Thr Asn Ser Ser Gln Asp Asp Asp Ala Asp Trp
1 5 10 15

Pro Arg Asn Ser Ser Ile Asp Glu Tyr Ile Ile His Asn Gly Thr Asn
20 25 30

Asp Thr Phe Glu Thr Leu Tyr Asp Val Pro Thr Gly Met Ile Val Leu
35 40 45

Leu Ser Phe Leu Tyr Gly Ser Ile Ser Val Leu Ala Val Val Gly Asn
50 55 60

Phe Leu Val Met Trp Val Val Ala Thr Ser Arg Arg Met Gln Ser Val
65 70 75 80

Thr Asn Cys Tyr Ile Ala Asn Leu Ala Leu Ala Asp Ile Val Ile Gly
85 90 95

Leu Phe Ala Val Pro Phe Gln Phe Gln Ala Ala Leu Leu Gln Arg Trp
100 105 110

Leu Leu Pro His Phe Met Cys Pro Phe Cys Pro Phe Val Gln Ala Leu
115 120 125

Ser Val Asn Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Ala Ile Ala Val Asp Arg
130 135 140

His Arg Ala Ile Ile Thr Pro Leu Ser Ala His Thr Ser Lys Arg Ile
145 150 155 160

Ala Lys Val Ile Ile Val Val Ile Trp Phe Leu Ala Leu Ser Leu Ala
165 170 175

Ala Pro Met Ala Met Ser Trp Glu Val Ile Met Glu Asp Glu Leu Asp
180 185 190

Pro Val Ala Lys Ile Phe Tyr Lys Lys Pro Phe Cys Ala Pro Thr Glu

195

200

205

Phe Gly Ser His Ser Leu Ala Ile Tyr Arg Leu Leu Leu Tyr Val Phe
 210 215 220

Gln Tyr Val Ile Pro Leu Cys Val Ile Thr Phe Ala Tyr Ala His Met
 225 230 235 240

Ala Met Lys Leu Trp Gly Ala Arg Ala Pro Gly Asn Ala Gln Glu Thr
 245 250 255

Arg Asp Ala Asn His Met Arg Asn Lys Lys Lys Val Ile Lys Met Leu
 260 265 270

Val Leu Val Val Ala Leu Phe Ala Leu Cys Trp Leu Pro Leu Gln Ser
 275 280 285

Tyr Leu Leu Leu Gln Ser Phe Phe Pro Ser Ile Asn Glu Tyr Lys Tyr
 290 295 300

Ile Asn Val Leu Phe Phe Cys Phe Asp Trp Leu Ala Met Ser Asn Ser
 305 310 315 320

Cys Tyr Asn Pro Phe Ile Tyr Ala Ile Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Lys
 325 330 335

Glu Phe Lys Gln Arg Phe Thr Phe Gly Lys Lys Pro Ser Arg Phe Val
 340 345 350

Asn Asp Ser Tyr Glu Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Thr Arg Ile Leu Ser
 355 360 365

Phe Arg Ser Thr Asn Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Arg Lys Ser Leu
 370 375 380

Asn Ile Pro Pro Gly Asp Thr Leu Lys Val Pro Ser Arg Asn Ser Cys
 385 390 395 400

His Cys Met Ala Asn Gln Ser Arg Glu Asn Gly Phe Asn Phe Met Lys
 405 410 415

Thr Glu Asp Met Glu Gly His Gly Asn Ser Arg Arg Tyr Leu Asn Ile
 420 425 430

Arg Met Ser Asn Pro Asp Ile Gly Lys Arg Arg Leu Ala Lys Lys Leu
 435 440 445

Ser Asn Arg Asp Asp Met Pro Ile Gly Asp Glu Arg Val Ser Glu Leu

450

455

460

Tyr Ile Phe Pro Asn Ser Asn Ile Val Glu Phe Thr Asp Ile Ser Tyr
465 470 475 480

Asp Asp Lys Val

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.